

## О ВНЕШНЕМ ВОЗДЕЙСТВИИ $\gamma$ -ИЗЛУЧЕНИЯ НА АКТИВНОСТЬ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗЫ В КЛЕТКАХ КРОВИ ОВЕЦ

Т.С. ШЕВЧЕНКО, И.В. КОНОПЛЕВА

В механизмах действия неблагоприятных факторов на организм млекопитающих особая роль отводится мессенджерным (регуляторным, или сигнал-трансдукторным) системам. Из них на внутриклеточном уровне к числу важнейших, влияющих на направленность метаболических реакций, относится система циклического аденозинмонофосфата (цАМФ). цАМФ-опосредованный механизм трансдукции сигнала многих гормонов, медиаторов и трансмиттеров, концентрация которых изменяется при действии радиационного фактора, предполагает участие аденилатциклазы — ключевого фермента в системе цАМФ. Поэтому возникает вопрос, вызывает ли внешнее воздействие  $\gamma$ -излучения на организм млекопитающих активацию аденилатциклазного сигнального пути в наиболее радиочувствительных клетках. Основная часть публикаций по этой проблеме связана с исследованиями на лабораторных животных, которые по физиологическим особенностям и радиорезистентности значительно отличаются от сельскохозяйственных. Кроме того, представляется важным определить возможные особенности функционирования аденилатциклазы в радиочувствительных клетках крови при радиационном поражении продуктивных животных. В связи с этим целью нашей работы стало изучение активности аденилатциклазы в лимфоцитах и тромбоцитах овец цыгайской породы, подвергнутых общему внешнему воздействию  $\gamma$ -излучения в дозе 4 Гр ( $LD_{50/30}$ ). В этих клетках, выделенных из крови овец, определяли базальную и стимулированную простагландином  $E_1$  активность аденилатциклазы. Кровь у животных отбирали из яремной вены до облучения и на 1-е, 3-и, 5-е, 7-е, 10-е, 15-е сут после воздействия. Контролем служила группа из 8 овец, которых содержали в тех же условиях, что и 8 подопытных животных. В лимфоцитах у всех 16 необлученных животных базальная активность аденилатциклазы составляла  $2,82 \pm 0,64$  пмоль/(мин  $\times 10^6$  кл.), стимулированная простагландином  $E_1$  —  $2,49 \pm 0,43$  пмоль/(мин  $\times 10^6$  кл.). В тромбоцитах эти показатели имели значения соответственно  $10,90 \pm 1,90$  и  $15,70 \pm 5,70$  пмоль/(мин  $\times 10^8$  кл.). С 1-х сут после воздействия отмечали изменение обеих компонент активности фермента и в лимфоцитах, и в тромбоцитах овец. В лимфоцитах наблюдали возрастание базальной активности аденилатциклазы в 1,7-4,3 раза и стимулированной активности — в 1,3-3,8 раза на протяжении всего срока исследования. Максимальные значения показателей в лимфоцитах регистрировали на 5-е сут. В тромбоцитах обнаружили увеличение базальной активности аденилатциклазы на 1-е и 7-е сут соответственно в 2,7 и 3,5 раза. Значения стимулированной простагландином  $E_1$  активности аденилатциклазы в тромбоцитах на 1-е и 7-е сут после облучения были повышены соответственно в 6,9 и 5,7 раза. В остальные сроки исследования величины изучаемых компонент активности фермента в тромбоцитах практически не отличались от контрольных значений. Таким образом, общее внешнее воздействие  $\gamma$ -излучения на организм овец приводит к увеличению активности аденилатциклазы и, следовательно, активации аденилатциклазного сигнального пути в лимфоцитах и тромбоцитах. Модификация активности аденилатциклазы в исследованных клетках крови вызвана, по-видимому, пострадиационным изменением структурно-функционального состояния цитоплазматических мембран, влияющим на ферменты и рецепторы аденилатциклазного сигнального каскада, а также нарушением морфологического состава периферической крови с преобладанием более устойчивой к лучевому повреждению субпопуляции клеток с повышенной активностью аденилатциклазы.

**Ключевые слова:** овцы, внешнее воздействие  $\gamma$ -излучения, лимфоциты, тромбоциты, система циклического аденозинмонофосфата (цАМФ), базальная активность аденилатциклазы, стимулированная простагландином  $E_1$  активность аденилатциклазы, сигнальные пути, цитоплазматические мембраны.

В механизмах действия различных неблагоприятных факторов на организм млекопитающих особая роль отводится мессенджерным (регуляторным, или сигнал-трансдукторным) системам (1-3). Важнейшими внеклеточными регуляторами считаются сигнальные молекулы — гормоны, медиаторы, трансмиттеры, внутриклеточными — системы циклических аденозин- и гуанозинмонофосфата (цАМФ, цГМФ),  $Ca^{2+}$ -кальмодулиновая и инозитолфосфатная (4-8). Трансдукция сигнала многих гормонов,

медиаторов и других первичных мессенджеров осуществляется через так называемые сигнальные пути. Например, в случае цАМФ-зависимого сигнального пути она реализуется благодаря функциональному взаимодействию встроенного в мембрану  $\beta$ -адренорецептора, G-белков и аденилатциклазы — ключевого фермента системы цАМФ (5, 9). В ответ на сигнал, поступающий от первичного мессенджера (сигнальной молекулы), активируется соответствующий рецептор на цитоплазматической мембране, который приводит к структурной модификации конформационного состояния молекул G-белков. В зависимости от активации  $G_s$ - или  $G_i$ -белков происходит стимулирование или ингибирование аденилатциклазы и, соответственно, ускорение или подавление синтеза цАМФ (вторичного мессенджера) (10-12). Далее цАМФ выполняет функции вторичного внутриклеточного мессенджера посредством активации (инактивации) клеточных протеинкиназ, которые, в свою очередь, фосфорилируют эффекторные белки и изменяют (повышают или снижают) их активность, что вызывает типичные для конкретного гормонального сигнала метаболические и функциональные сдвиги, меняя и соответствующие функции клеток (3, 13, 14). Через цАМФ-зависимую систему трансмембранной передачи сигналов регулируется метаболизм, пролиферация и дифференцировка клеток, экспрессия генов; она также играет важную роль в кроветворении, клеточном иммунитете, регуляции апоптоза, при вирусной инфекции и других процессах (15-23).

Выявлено участие внутриклеточных мессенджерных систем в поддержании нормального гемостаза и активации тромбоцитов при их агрегации (24). Получены экспериментальные доказательства участия аденилатциклазного сигнального пути в стимуляции биохимических процессов, приводящих к изменению деформируемости эритроцитов, благодаря чему они эффективнее обеспечивают кислородом органы и ткани. Обнаружена также потребность в активации кальциевого сигнального каскада для повышения стабильности мембраны и клетки в целом (25-29). Кроме того, показана возможность перекрестного взаимодействия цАМФ с  $Ca^{2+}$ -зависимым путем передачи сигнала (30).

Экспериментально доказано, что воздействие  $\gamma$ -излучения на организм животных приводит к изменению содержания в тканях и периферической крови катехоламинов, кортикостероидов, серотонина и других биологически активных соединений, которые представляют собой сигнальные молекулы, активирующие мембранные рецепторы соответствующих сигнальных путей (5, 31). У лабораторных (32-35) и сельскохозяйственных животных (36-38) в ряде клеточных популяций обнаружены пострадикационные нарушения активности ферментов некоторых мессенджерных систем.

Внешнее воздействие  $\gamma$ -излучения на млекопитающих в дозах 2-10 Гр в первую очередь поражает систему кроветворения, в результате чего происходит убыль клеток костного мозга и периферической крови (31). Поэтому возникает вопрос, вызывает ли такое воздействие активацию цАМФ-зависимого сигнального пути в радиочувствительных клетках периферической крови. Следует отметить, что основная часть публикаций по проблеме связана с исследованиями на лабораторных животных, однако по физиологическим особенностям и радиорезистентности они значительно отличаются от сельскохозяйственных животных.

Мы изучили базальную и стимулированную простагландином  $E_1$  активность аденилатциклазы в лимфоцитах и тромбоцитах овец, подвергнутых общему внешнему воздействию  $\gamma$ -излучения.

*Методика.* Исследования проводили на овцах цыгайской породы (16 гол.) с живой массой  $32,35 \pm 0,08$  кг, которых содержали в условиях

вивария (Всероссийский НИИ радиологии и агроэкологии). Рацион был сбалансирован согласно нормам Всероссийского НИИ животноводства (Московская обл.). Контролем служила группа из 8 овец, которых содержали в тех же условиях, что и подопытных животных. Группу подопытных животных (8 гол.) подвергали общему внешнему воздействию  $\gamma$ -излучения в полудетальной дозе ( $LD_{50/30}$ ) 4 Гр при мощности дозы 1 Гр/ч на установке ГУЖ-24 (Россия) (источник излучения —  $^{137}\text{Cs}$  с энергией  $\gamma$ -квантов 0,67 МэВ). Степень и равномерность облучения контролировали с помощью дозиметра VAI-18 (Германия) со сферической ионизационной камерой VAK-253 (Германия). Неравномерность  $\gamma$ -поля не превышала  $\pm 15\%$ .

Кровь у животных отбирали из яремной вены до облучения и на 1-е, 3-е, 5-е, 7-е, 10-е, 15-е сут после воздействия. Антикоагулянтом служил цитрат натрия в конечной концентрации 0,38 %.

Популяции тромбоцитов и лимфоцитов овец выделяли разработанным нами способом (39). Изолированные клетки промывали 2 раза в растворе, содержащем NaCl, KCl,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{MgCl}_2$ , глюкозу и N-(2-гидроксиэтил)пиперазин-N'-(2-этансульфоновую кислоту) (соответственно 145; 5; 0,5; 1; 3 и 10 мМ при pH 7,4). Клетки в полученных суспензиях подсчитывали в камере Горяева. Перед проведением ферментативной реакции aliquоту тромбоцитов замораживали, лимфоцитов — лизировали в гипотонической среде 30 мин при температуре 4 °С.

Активность аденилатциклазы в лизатах клеток определяли в соответствии с условиями, описанными ранее (40). В качестве меченых субстратов ферментативных реакций использовали [ $^{14}\text{C}$ ]-АТФ и [ $^3\text{H}$ ]-цАМФ («GE Healthcare», Великобритания). Продукты ферментативных реакций разделяли методом тонкослойной хроматографии на пластинах Silufol UV-254 («Chemapol», Чехия). Инкубационная среда для анализа фермента включала АТФ, ГТФ,  $\text{MgSO}_4$ , этиленгликоль-ди/ $\beta$ -аминоэтиловый эфир/-N,N-уксусной кислоты (EGTA), креатинфосфат, Трис-HCl — соответственно 0,5; 0,1; 10; 2; 5; 50 мМ, а также креатинкиназу (40 ед/мл) и 37 КБк  $^{14}\text{C}$ -АТФ (pH 7,4). Реакцию проводили в гомогенатах клеток в присутствии ингибитора фосфодиэстеразы EGTA при температуре 30 °С. Гормон-стимулированную активность аденилатциклазы определяли в присутствии простагландина  $E_1$  ( $10^{-5}$  М) по разнице показателя в присутствии активатора и без него. Радиоактивность образцов подсчитывали на жидкостно-сцинтилляционном счетчике SL-4220 («Intertechnique», Франция).

Статистическую обработку осуществляли с использованием t-критерия Стьюдента и пакета программ Microsoft Excel 2003. Различия между значениями в контроле и опыте считали достоверными при  $p < 0,05$ .

*Результаты.* Жизнеспособность выделенных клеточных популяций, оцениваемая в тесте с трипановым синим, составляла 90-95 %.

Базальная активность аденилатциклазы — это компонента активности синтезирующего цАМФ фермента, связанная с каталитической субъединицей в отсутствие стимулирующего или ингибирующего действия на клетку физиологически активных соединений (41). В лимфоцитах необлученных овец она составляла  $2,82 \pm 0,64$  пмоль/(мин  $\times 10^6$  кл.). Эти данные согласуются с аналогичным показателем у крупного рогатого скота (КРС) —  $2,0 \pm 0,4$  пмоль/(мин  $\times 10^6$  кл.) (38). У контрольных животных активность фермента практически не изменялась в течение срока исследования.

При внешнем воздействии  $\gamma$ -излучения на овец базальная активность аденилатциклазы в лимфоцитах возрастала с 1-х сут (табл.). В этот срок она повышалась в 1,73 раза по сравнению с показателем у необлученных животных. На 3-е и 5-е сут базальная активность фермента в лимфо-

цитах увеличивалась соответственно в 2,15 и 4,32 раза. В последующие сроки также регистрировали возросшие значения параметра: на 7-е сут — в 2,22 раза, на 10-е — в 2,94 раза, на 15-е сут — в 3,26 раза. То есть базальная активность аденилатциклазы в лимфоцитах у облученных овец оставалась повышенной в 1,7-4,3 раза на протяжении всего эксперимента.

**Базальная и стимулированная активность (БА и СА) аденилатциклазы в лимфоцитах и тромбоцитах у облученных и необлученных овец цыгайской породы ( $X \pm x$ ; виварий Всероссийского НИИ радиологии и агроэкологии, г. Обнинск)**

Время после облучения, сут	Лимфоциты, пмоль/(мин $\times 10^6$ кл.)		Тромбоциты, пмоль/(мин $\times 10^8$ кл.)	
	БА	СА	БА	СА
До облучения ( $n = 16$ )	2,82 $\pm$ 0,64	2,49 $\pm$ 0,43	10,90 $\pm$ 1,90	15,70 $\pm$ 5,70
	Контроль (без облучения), $n = 8$			
1-е	2,66 $\pm$ 0,64	2,53 $\pm$ 0,42	10,40 $\pm$ 1,20	17,20 $\pm$ 3,30
3-и	2,97 $\pm$ 0,55	2,34 $\pm$ 0,36	10,10 $\pm$ 0,08	16,50 $\pm$ 2,30
5-е	2,64 $\pm$ 0,52	2,33 $\pm$ 0,31	11,20 $\pm$ 1,30	15,40 $\pm$ 0,90
7-е	3,03 $\pm$ 0,44	2,47 $\pm$ 0,28	10,20 $\pm$ 0,07	17,20 $\pm$ 0,80
10-е	2,92 $\pm$ 0,36	2,32 $\pm$ 0,44	9,80 $\pm$ 1,20	13,30 $\pm$ 0,54
15-е	3,11 $\pm$ 0,45	2,45 $\pm$ 0,33	9,60 $\pm$ 1,10	13,50 $\pm$ 0,70
	Опыт, $n = 8$			
1-е	4,88 $\pm$ 0,56*	7,35 $\pm$ 0,26*	26,80 $\pm$ 7,10	107,50 $\pm$ 27,50*
3-и	6,05 $\pm$ 1,62	7,33 $\pm$ 0,11*	9,70 $\pm$ 3,00	16,60 $\pm$ 6,30
5-е	12,17 $\pm$ 1,44*	21,80 $\pm$ 5,16*	5,10 $\pm$ 0,60*	13,40 $\pm$ 3,40*
7-е	6,25 $\pm$ 1,10*	5,31 $\pm$ 1,01*	38,60 $\pm$ 8,60*	89,50 $\pm$ 16,50
10-е	8,30 $\pm$ 1,90*	3,22 $\pm$ 0,58	9,50 $\pm$ 2,10	9,80 $\pm$ 4,50
15-е	8,20 $\pm$ 0,60*	6,91 $\pm$ 0,51*	9,30 $\pm$ 0,70	8,30 $\pm$ 0,30

\*  $p < 0,05$  по сравнению с необлученными животными.

Стимулированная активность аденилатциклазы — это активность в присутствии эффектора простагландина  $E_1$ , связанная с функционированием гормональной субъединицы фермента (41). Величина этого показателя в лимфоцитах у всех 16 животных до облучения составляла в среднем 2,49 $\pm$ 0,43 пмоль/(мин  $\times 10^6$  кл.). На 1-е сут после воздействия стимулированная активность аденилатциклазы увеличивалась в 2,95 раза по сравнению с показателем у необлученных животных. На 3-и и 5-е сут она возрастала соответственно в 2,94 и 3,76 раза, на 7-е и 10-е сут — была выше в 1,83 и 1,29 раза. На 15-е сут величина этого показателя возрастала в 2,78 раза. Следовательно, значения стимулированной простагландином  $E_1$  активности аденилатциклазы в лимфоцитах после воздействия  $\gamma$ -излучения оставались увеличенными в 1,3-3,8 раза во все сроки исследования.

Поскольку базальная активность аденилатциклазы связана с каталитической субъединицей фермента, а стимулированная — с гормональной, развитие радиационного поражения у овец приводило к усилению функционирования и каталитической, и гормональной субъединиц аденилатциклазного ферментного комплекса лимфоцитов.

Базальная активность аденилатциклазы в тромбоцитах у всех 16 необлученных животных составляла 15,70 $\pm$ 5,70 пмоль/(мин  $\times 10^8$  кл.), что соответствовало результатам, полученным у КРС — 13,3 $\pm$ 3,0 пмоль/(мин  $\times 10^8$  кл.) (38). На 1-е сут после облучения базальная активность фермента в тромбоцитах овец увеличивалась в 2,73 раза, а на 3-и сут была такой же, как до воздействия. На 5-е сут она снижалась в 2,14 раза, на 7-е сут вновь повышалась в 3,54 раза. В последующие сроки ее значения соответствовали показателю у контрольных животных. Стимулированная простагландином  $E_1$  активность аденилатциклазы в тромбоцитах на 1-е и 7-е сут после воздействия увеличивалась соответственно в 6,85 и 5,70 раза. Во все другие сроки она достоверно не отличалась от таковой в контроле.

Таким образом, общее внешнее воздействие  $\gamma$ -излучения вызывало

у овец модификацию активности аденилатциклазы во всех исследованных типах клеток крови. То есть при облучении происходит активация аденилатциклазного сигнального пути и в радиочувствительных лимфоцитах, и в относительно радиорезистентных тромбоцитах. В лимфоцитах облученных животных активность обоих компонент аденилатциклазы возрастает с 1-х сут, в тромбоцитах — на 1-е и 7-е сут. Процессы, происходящие в этом ферментном комплексе обоих типов клеток, затрагивают и каталитическую, и регуляторную субъединицы аденилатциклазы. Функциональная активность аденилатциклазы в первую очередь зависит от конформации макромолекулы и ее взаимодействий с компонентами цитоплазматической клеточной мембраны, в которую аденилатциклаза встроена (41). Биологические мембраны рассматриваются как одна из мишеней при действии ионизирующей радиации на клетки (42-44). Поэтому не вызывает сомнений, что модификация активности аденилатциклазы в лимфоцитах и тромбоцитах обусловлена изменением структурно-функционального состояния их плазматических мембран, индуцированным радиационным воздействием.

Наблюдаемое увеличение активности аденилатциклазы после внешнего  $\gamma$ -облучения может объясняться и другими причинами. Известно, что развитие радиационного поражения млекопитающих сопровождается интерфазной гибелью лимфоцитов (41). При этом в периферической крови животных происходит изменение субпопуляционного состава этих клеток — массовая убыль наиболее радиочувствительных В-лимфоцитов ( $D_0$  составляет 1,2-1,8 Гр) и увеличение относительного содержания более радиорезистентных Т-лимфоцитов (для основной части субпопуляции  $D_0$  равняется 2,0-2,5 Гр, а для 3-8 % — превышает 10 Гр) (45). То есть популяция лимфоцитов, циркулирующая в кровеносном русле после радиоиндуцированной гибели в начальный период и период разгара лучевой болезни, представлена в основном наиболее радиорезистентными Т-лимфоцитами, сохраняющимися в периферической крови длительное время (срок жизни составляет 200-300 сут) (45, 46). Можно полагать, что повышенная функциональная активность аденилатциклазы в лимфоцитах связана не только с пострадиационной модификацией цитоплазматической мембраны, но в большей степени является характерной особенностью клеток, циркулирующих в кровеносном русле после гибели самой радиочувствительной субпопуляции лимфоцитов. Очевидно, что после воздействия  $\gamma$ -излучения на организм овец в периферической крови остаются наиболее радиорезистентные лимфоциты, возможно, с другими свойствами цитоплазматической мембраны, обладающие большим содержанием белка (47), внутриклеточного кальция (48) и большей активностью аденилатциклазы.

Тромбоциты имеют еще более высокую радиорезистентность, чем Т-лимфоциты. Срок их жизни в кровеносном русле составляет в норме 5-10 сут, в результате чего к 7-м сут тромбоцитарная популяция в периферической крови значительно обновляется (49). И если воздействие  $\gamma$ -излучения на активность аденилатциклазы в тромбоцитах в начальный период лучевого поражения реализуется в основном через нарушения в цитоплазматической мембране, то изменение активности фермента на 7-е сут, по-видимому, связано с выходом из пула костного мозга в кровь новых клеток с качественно иными свойствами. У обновленной популяции тромбоцитов активность аденилатциклазы (как базальная, так и стимулированная простагландином  $E_1$ ) значительно повышена.

Итак, при развитии острого лучевого поражения после общего внешнего воздействия  $\gamma$ -излучения в полудетальной дозе у овец наблюдалась модификация функционирования аденилатциклазы как в радиочувств-

вительных лимфоцитах, так и в относительно радиорезистентных тромбоцитах. В лимфоцитах базальная и стимулированная простагландином E<sub>1</sub> активность оставалась повышенной на протяжении всего срока исследования — с 1-х по 15-е сут (максимум приходился на 5-е сут). В тромбоцитах базальная и стимулированная активность аденилатциклазы возрастала на 1-е и 7-е сут соответственно в 2,7 и 3,5 раза и 6,9 и 5,7 раза (в остальные сроки отличий от исходных значений не было). Следовательно, активация аденилатциклазного сигнального пути происходила в клетках обоих типов. Выявленная модификация активности фермента, по-видимому, вызвана пострадиационным изменением структурно-функционального состояния цитоплазматических мембран клеток, влияющим на ферменты и рецепторы аденилатциклазного сигнального каскада, а также нарушением морфологического состава периферической крови с преобладанием более устойчивой к лучевому повреждению субпопуляции клеток с повышенной активностью аденилатциклазы.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Фаллер Д., Шилдс Д. Молекулярная биология клетки. М., 2003.
2. Мушкхамбаров Н.Н., Кузнецов Л.М. Молекулярная биология, М., 2007.
3. Кулинский В.И., Колесниченко Л.С. Молекулярные механизмы действия гормонов. II. Киназные системы. Системы с внутриклеточными рецепторами. Трансактивация СТС (Обзор). Биохимия, 2005, 70(5): 476-492.
4. Ширшев С.В. Роль белков EPAC в механизмах cAMP-зависимой иммунорегуляции. Биохимия, 2011, 76(9): 1205-1224.
5. Смирнов А.Н. Элементы эндокринной регуляции /Под ред. В.А. Ткачука. М., 2008.
6. Nunomura W., Takakuwa Y. Regulation of protein 4. 1R interactions with membrane proteins by Ca<sup>2+</sup> and calmodulin. Front Biosci., 2006, 11: 1522-1539.
7. Wang N., De Bock M., Decrock E., Bol M., Gadicherla A.A., Leybaert L., Vinken M., Rogiers V., Bukauskas F.F., Bultynck G. Paracrine signaling through plasma membrane hemichannels. Biochimica et Biophysica Acta (BBA). Biomembranes, 2013, 1828(1): 35-50 (doi: 10.1016/j.bbame.2012.07.002).
8. Kupchik Y.M., Barchad-Avitzur O., Ben-Chaim Y., Parnas L., Parnas H., Wess J. A novel fast mechanism for GPCR-mediated signal transduction — control of neurotransmitter release. Journal of cell biology, 2011, 192(1): 137-151 (doi: 10.1083/jcb.201007053).
9. Соломонова В.Г., Авдониин П.П., Винниченко Е.С., Суханова И.Ф., Авдониин П.Ф. Активация сократимости сердца виноградной улитки *H. pomatia* под действием тромбина. Исследование роли cAMP. Журнал эволюционной биохимии и физиологии, 2007, 43: 32-38.
10. Авдониин П.В. Структура и сигнальные свойства сопряженных с G-белками рецепторных комплексов. Биологические мембраны: журнал мембранной и клеточной биологии, 2005, 22(1): 3-26.
11. Zamponi G.W., Currie K.P.M. Regulation of Ca<sub>v</sub>2 Calcium channels by G protein coupled receptors. Biochimica et Biophysica Acta (BBA). Biomembranes, 2013, 1828(7): 1629-1643 (doi: 10.1016/j.bbame.2012.10.004).
12. Sprague R., Bowles E., Stumpf M., Ricretts G., Freidman A., Hou W.H., Stephenson A., Lonigro A. Rabbit erythrocytes possess adenilate cyclase type II that is activated by the heterotrimeric G proteins G<sub>s</sub> and G<sub>i</sub>. Pharmacol. Rep., 2005, 57: 222-228.
13. Creighton J.R., Asada N., Cooper D.M., Steven T. Coordinate regulation of membrane cAMP by Ca<sup>2+</sup>-inhibited adenilyl cyclase and phosphodiesterase activities. Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol., 2003, 284: 100-107.
14. Francis S.H., Corbin J.D. Cyclic nucleotide-dependent protein kinases: intracellular receptors for cAMP and cGMP action. Crit. Rev. Clin. Lab. Sci., 1999, 36(4): 275-328 (doi: 10.1080/10408369991239213).
15. Whitefield J.F., Bounton A.L., Macmanus J.P., Korska M., Tsang B.K. The regulation of cell proliferation by calcium and cyclic AMP. Mol. Cell Biochem., 1979, 27: 155-179 (doi: 10.1007/BF00215364).
16. Авдониин П.В., Кожевникова Л.М. Регуляция экспрессии и функциональной активности сопряженных с G-белками рецепторов. Нарушения этих процессов при патологиях. Биологические мембраны: журнал мембранной и клеточной биологии, 2007, 24(1): 4-31.
17. Baroja-Mazo A., Barbera-Cremades M., Pelegrin P. The participation of plasma membrane hemichannels to purinergic signaling. Biochimica et Biophysica Acta (BBA).

- Biomembranes, 2013, 1828(1): 79-93 (doi: 10.1016/j.bbamem.2012.01.002).
18. Хаитов Р.М., Манько В.М., Ярилин А.А. Внутриклеточные сигнальные пути, активирующие или ингибирующие функции клеток иммунной системы. 1. Молекулярные механизмы формирования активирующих сигнальных путей фагоцитов, опосредованных через Fc- и TLR-рецепторы. Успехи современной биологии, 2005, 125(4): 348-359.
  19. Хаитов Р.М., Манько В.М., Ярилин А.А. Внутриклеточные сигнальные пути, активирующие или ингибирующие функции клеток иммунной системы. 2. Сигналпроводящие активирующие и ингибирующие рецепторы естественных клеток-киллеров. Успехи современной биологии, 2005, 125(5): 435-445.
  20. Хаитов Р.М., Манько В.М., Ярилин А.А. Внутриклеточные сигнальные пути, активирующие или ингибирующие функции клеток иммунной системы. 3. Формирование и регуляция сигнальных путей, индуцируемых активацией антигенраспознающих рецепторных структур Т- и В-лимфоцитов. Успехи современной биологии, 2005, 125(6): 544-554.
  21. Хаитов Р.М., Манько В.М., Ярилин А.А. Внутриклеточные сигнальные пути, активирующие или ингибирующие функции клеток иммунной системы. 4. Внутриклеточные сигнальные пути при апоптозе. Успехи современной биологии, 2006, 126(1): 3-9.
  22. Green D.R. Overview: apoptotic signaling pathways in the immune system. Immunol. Rev., 2003, 193: 5-9.
  23. Орловская И.А., Козлов В.А., Топоркова Л.Б. Внутриклеточные сигнальные системы в регуляции апоптоза эритроидных клеток. Иммунология, 2006, 27(5): 312-316.
  24. Шатурный В.И., Шахиджанов С.С., Свешникова А.Н., Пантелеев М.А. Активаторы, рецепторы и пути внутриклеточной сигнализации в тромбоцитах крови. Биомедицинская химия, 2014, 60(2): 182-200.
  25. Manno S., Takakuwa Y., Mohandas N. Modulation of erythrocyte membrane mechanical function by protein 4.1 phosphorylation. J. Biol. Chem., 2005, 280: 7581-7587 (doi: 10.1074/jbc.M410650200).
  26. Muravyov A.V., Cherogov S.V., Kislov N.V., Volkova E.L. Macro- and micro-rheological changes in patients with solid tumors after treatment with recombinant erythropoietine (Epoetin-beta). Clin. Hemorheol. Microcirc., 2009, 41: 39-47.
  27. Muravyov A.V., Tikhomirova I.A., Maimistova A.A., Bulaeva S.V., Zamishlayev A.V. Crosstalk between adenylyl cyclase signaling pathway and Ca<sup>2+</sup> regulatory mechanism under red blood cell micro-rheological changes. Clin. Hemorheol. Microcirc., 2010, 45: 337-345.
  28. Муравьев А.В., Кошелев В.Б., Фадюкова О.Е., Тихомирова И.А., Маймистова А.А., Булаева С.В. Роль активации аденилатциклазной системы эритроцитов в изменении микро-релеологических свойств их мембран. Биологические мембраны: журнал мембранной и клеточной биологии, 2011, 28(3): 174-180.
  29. Муравьев А.В., Михайлова С.Г., Тихомирова И.А. Роль внутриклеточных сигнальных систем в изменении микро-релеологических свойств эритроцитов. Биологические мембраны: журнал мембранной и клеточной биологии, 2014, 31(4): 270-277 (doi: 10.7868/S0233475514040069).
  30. Bruce J.I., Straub S.V., Yule D.I. Crosstalk between cAMP and Ca<sup>2+</sup> signaling in non-excitable cells. Cell Calcium, 2003, 34: 431-444.
  31. Кудряшов Ю.Б. Радиационная биофизика (ионизирующие излучения). М., 2004.
  32. Коваленко А.Н., Коваленко В.В. Роль циклических нуклеотидов в реализации нейроэндокринных сдвигов после радиационного воздействия. Системные радиационные синдромы. Николаев, 2008.
  33. Чубанов В.С., Рогов Ю.И., Конопля Е.Ф., Шолух М.В. Функциональное взаимодействие компонентов аденилатциклазной системы печени крыс после пренатального воздействия  $\gamma$ -излучения. Радиационная биология. Радиоэкология, 1999, 39(4): 394-398.
  34. Hunt W.A., Dulton T.K. Synthesis and degradation of cyclic nucleotides in brain after a high dose of ionizing radiation. Radiat. Res., 1981, 85(3): 604-608.
  35. Соболев А.С. Пострадиационные изменения в системе циклического АМФ органов и тканей, различающихся по радиопооражаемости. В сб.: Проблемы природной и модифицированной радиочувствительности. М., 1983: 205-212.
  36. Шукин В.М. Метаболизм циклических нуклеотидов в лимфоидных органах жвачных животных при внешнем и внутреннем радиационном воздействии. Автореф. канд. дис. М., 2000.
  37. Мирзоев Э.Б., Кобялко В.О., Коноплева И.В., Шевченко Т.С., Губина О.А., Верховский Ю.Г. Оценка проницаемости плазматической мембраны для Ca<sup>+2</sup> и активности аденилатциклазы в клетках периферической крови овец, облученных в малых дозах. Радиационная биология. Радиоэкология, 2002, 42(3): 274-278.
  38. Шевченко Т.С., Коноплева И.В. Активность аденилатциклазы в лимфоцитах и тромбоцитах облученного крупного рогатого скота. Сельскохозяйственная биология, 2011, 2: 63-67.
  39. Шевченко Т.С. Выделение клеточных популяций из периферической крови сельскохозяйственных животных. Сельскохозяйственная биология, 2007, 6: 123-126.
  40. Шевченко А.С. Определение активности ферментов метаболизма циклического аденозинмонофосфата в клетках крови овец и лошадей. Сельскохозяйственная биология, 1988, 6: 124-125.

41. Соболев А.С. Радиационная биохимия циклических нуклеотидов. М., 1987.
42. Севериновская Е.В., Зайченко Е.Ю. Оценка функционального состояния клеточных мембран при хроническом облучении организма. Успехи современной биологии, 2007, 127(3): 283-292.
43. Бурлакова Е.Б., Аткарская М.В., Фаткуллина Л.Д., Андреев С.Г. Радиационно-индуцированные изменения структурного состояния мембран клеток крови человека. Радиационная биология. Радиоэкология, 2014, 54(2): 162-168 (doi: 10.7868/S0869803114020040).
44. Maeshima Y., Makino H. Molecular mechanism of cell injury. Contrib. Nephrol., 2003, 139: 32-43.
45. Ярилин А.А. Действие ионизирующей радиации на лимфоциты (повреждающий и активизирующий эффекты). Иммунология, 1988, 5: 5-11.
46. Селиванова Е.И., Замулаева И.А., Саенко А.С. Влияние хронического облучения на распределение субпопуляций лимфоцитов крови у профессионалов-атомщиков. Радиационная биология. Радиоэкология, 2014, 54(2): 153-161 (doi: 10.7868/S0869803114020106).
47. Шевченко Т.С. Влияние внешнего  $\gamma$ -излучения на общее содержание белка в лимфоцитах и тромбоцитах овец. Сельскохозяйственная биология, 2013, 4: 115-120 (doi: 10.15389/agrobiol.2013.4.115rus, 10.15389/agrobiol.2013.4.115eng).
48. Шевченко Т.С., Коноплева И.В. Общее содержание кальция в лимфоцитах и тромбоцитах облученных овец. Сельскохозяйственная биология, 2011, 2: 63-67.
49. Gresle P., Page C., Fuster V. Platelets. Cambridge, Cambridge Academy Press, 2002.

*ФГБНУ Всероссийский НИИ радиологии и агроэкологии, Поступила в редакцию*  
 239032 Россия, Калужская обл., г. Обнинск, Киевское ш., 109 км, 5 марта 2015 года  
 e-mail: riar@obninsk.org, Shevchenkotatyana@yandex.ru

*Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 2015, V. 50, № 4, pp. 495-502

## EFFECTS OF EXTERNAL $\gamma$ -RADIATION ON ADENYLATE CYCLASE ACTIVITY IN SHEEP BLOOD CELLS

*T.S. Shevchenko, I.V. Konopleva*

*All-Russian Research Institute of Radiology and Agroecology, Federal Agency of Scientific Organizations, 109 km, Kievskoe sh., Obninsk, Kaluga Province, 239032 Russia, e-mail riar@obninsk.org, Shevchenkotatyana@yandex.ru*  
*Received March 5, 2015* doi: 10.15389/agrobiol.2015.4.495eng

### Abstract

In the mechanisms of action of various adverse factors on mammals a special part is assigned to the regulatory systems. The main regulatory system of cellular metabolism is the cAMP system. Exposure of animals to external  $\gamma$ -radiation results in the modification of different biochemical processes in cells. In studying diversified intercellular disorders after irradiation it is, therefore, necessary to assess functioning of the cAMP system and its key enzyme, the adenylate cyclase. Note that the data published on the effect of  $\gamma$ -irradiation are mainly obtained with laboratory animals which are significantly different from farmed animals in the body features, whereas the effect in highly productive animals is of special interest. We studied an influence of  $\gamma$ -irradiation on cAMP in Tsygai sheep for the first time and showed a cAMP modification both in the lymphocytes susceptible to radiation and in the thrombocytes which are relatively resistant. In this paper the data are shown on the basal and prostaglandin E<sub>1</sub> stimulated activity of adenylate cyclase in radiosensitive blood cells of sheep exposed to total external  $\gamma$ -radiation at a dose of 4 Gy (LD<sub>50/30</sub>) for 15 days. In the intact sheep lymphocytes a basal and E<sub>1</sub> stimulated adenylate cyclase activity was 2.82±0.64 pmol/(min × 10<sup>6</sup> cells) and 2.49±0.43 pmol/(min × 10<sup>6</sup> cells), respectively, and in the thrombocytes it amounted 10.90±1.90 pmol/(min × 10<sup>8</sup> cells) and 15.70±5.70 pmol/(min × 10<sup>8</sup> cells), respectively. From the first day after exposure, changes have been revealed in all activity components of this enzyme in the lymphocytes and thrombocytes of sheep. The lymphocytes showed a 1.7-4.3-fold increase in the basal adenylate cyclase activity on days 1-15 and 1.3-3.8-fold increase in the stimulated activity on days 1-10. In thrombocytes the basal activity of adenylate cyclase increased 2.7 and 3.5 times on days 1 and 7, respectively, and the prostaglandin E<sub>1</sub> stimulated activity of adenylate cyclase grew 6.9 and 5.7 times on days 1 and 7 after exposure, respectively. In all other days the adenylate cyclase activity components of interest didn't practically differ from the initial level. This suggests that i) modification of adenylate cyclase activity is caused by postradiation alteration of the structural-functional condition of plasma membranes in these blood cells, and ii) in the peripheral blood there is a prevalence of more resistant to radiation damage subpopulation of lymphocytes and thrombocytes with increased adenylate cyclase activity.

**Keywords:** sheep, external  $\gamma$ -radiation, lymphocytes, thrombocytes, cyclic adenosine monophosphate system (cAMP), basal and prostaglandin E<sub>1</sub> stimulated activity of adenylate cyclase.